Notice utilisateur

Trousses HISTO TYPE SSP

CE 0123

Trousses de test pour le typage tissulaire des allèles HLA
(Classe I : HLA-A, B, C et Classe II : HLA-DR, DQ)
par technique de biologie moléculaire

IVD

20 typages
prêts à l'emploi, pré-aliquotés

RÉF 70721 : HISTO TYPE A low	**(rouge)**
RÉF 70731 : HISTO TYPE B low	**(blanc)**
RÉF 70741 : HISTO TYPE C low	**(jaune)**
RÉF 70751 : HISTO TYPE DR low	**(violet)**
RÉF 70891 : HISTO TYPE DQB low	**(blanc)**
RÉF 7098 : HISTO TYPE A/B/DR	**(blanc)**
RÉF 7102 : HISTO TYPE A/B/C	**(bleu)**
RÉF 7103 : HISTO TYPE DR/DQ	**(blanc)**
RÉF 709010 : HISTO TYPE DQB high	**(bleu)**
RÉF 70903 : HISTO TYPE DQB1*03	**(violet)**

Table des matières

1. Description du produit 2
2. Matériel 2
   2.1. Contenu des trousses HISTO TYPE SSP 2
   2.2. Matériel supplémentaire nécessaire 3
   2.3. Conservation et stabilité 4
3. Données de performance 4
4. Protocole 4
   4.1. Conditions de sécurité et remarques spécifiques 4
   4.2. Isolement de l'ADN 5
   4.3. Amplification 5
   Électrophorèse sur gel 8
   4.4. Documentation et interprétation 8
5. Avertissements et traitement des déchets 9
6. Dépannage 10
7. Bibliographie 11
8. Explication des symboles utilisés sur les emballages 11

Version : 9 (2013)

Distribué en Belgique, en France, au Luxembourg et en Suisse par :

médiane diagnostics Z.A. de la Chaîne 78370 PLAISIR **+33 1.30.07.50.60** **info@mediane-diag.fr**

AG Health Care GmbH
Amtsgerichtsstraße 1-5
35423 Lich/Germany
Tel.: +49 (0) 6404 / 925-0
Fax: +49 (0) 6404 / 925-250
www.bag-healthcare.com
info@bag-healthcare.com
verkauf@bag-healthcare.com

Auftragsannahme/Ordering:
Tel.: +49 (0) 6404 / 925-450
Fax: +49 (0) 6404 / 925-460
service@bag-healthcare.com

Customer Service:
Tel.: +49 (0) 6404 / 925-125
Fax: +49 (0) 6404 / 925-421

1. Description du produit

Le typage HLA a fait beaucoup de progrès récemment grâce à l'utilisation de la PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Le séquençage des allèles HLA [1] facilite le typage sans ambiguïté au niveau de l'ADN avec une haute résolution, et présente de nombreux avantages par rapport aux méthodes sérologiques traditionnellement utilisées.

L'ADN purifié constitue le matériau de base du typage avec les trousses **HISTO TYPE SSP**. Le test est réalisé par PCR-SSP (PCR par amorces spécifiques de séquence ou *Sequence Specific Primers*) (voir figure 1) [2, 3]. Cette méthode est basée sur le fait que l'extension de l'amorce, et donc la réussite de la PCR repose sur l'appariement exact de l'extrémité 3' des deux amorces. Donc, l'amplification n'est obtenue que si les amorces correspondent en totalité à la séquence cible. Elle est ensuite visualisée par électrophorèse sur gel d'agarose.

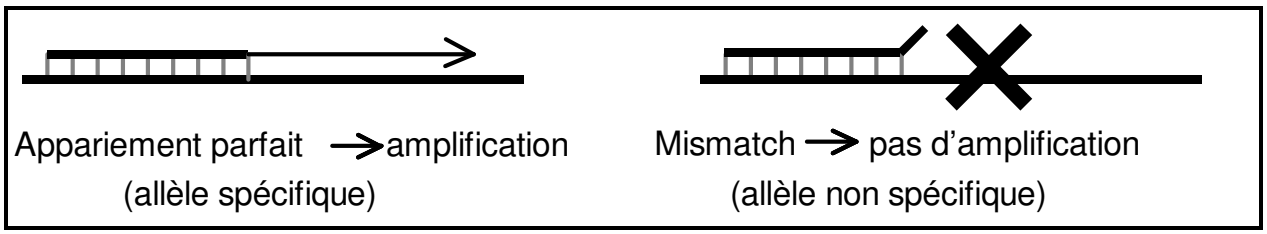


Figure 1: principe de la PCR-SSP

La composition des mélanges individuels d'amorces permet une identification claire des types HLA indiqués sur les diagrammes d'évaluation respectifs. Chaque typage utilise un certain nombre (24 ou 96) de mélanges réactionnels **pré-aliquotés** et **séchés** d'un volume final de 10 µL et comprenant un contrôle interne d'amplification.

2. Matériel

2.1. Contenu des trousses HISTO TYPE SSP

- 20 plaques HISTO TYPE permettant 20 typages HLA. Les mélanges réactionnels pré-aliquotés et séchés sont composés des amorces spécifiques de l'allèle, des amorces du contrôle interne (spécifique du gène humain G3PDH) et de nucléotides. Le premier mélange réactionnel (n°1) est marqué (consulter page 7 pour le schéma des mélanges). Dans certaines trousses HISTO TYPE, le contrôle de contamination se situe sur le dernier emplacement de la plaque (consulter la table de spécificité et la table d'interprétation spécifiques du lot). Le numéro du lot est imprimé sur chaque plaque/barrette.

- 3 barrettes (à 8x) de contrôles de contamination contenant les amorces du contrôle interne et les amorces spécifiques de l'amplicon (ne sont pas jointes aux trousses où le contrôle de contamination est intégré au dernier emplacement de la plaque PCR)
- Tampon PCR 10x en quantité suffisante pour 20 typages.
- Bouchons de barrette ou opercules PCR en quantité suffisante pour 20 typages.
- Notice d'utilisation, table de spécificité, table d'interprétation et fiche de travail.

2.2. Matériel supplémentaire nécessaire

- Enzyme Taq Polymérase (5 U/µL), (par exemple: **HISTO TAQ**, Réf. 70975)
  N.B.: n'utiliser en aucun cas une Taq Polymérase de qualité "*hot-start*" !
- Trousse d'extraction d'ADN, (par exemple : **BAG EXTRA-GENE**, Réf 7059, pour une extraction manuelle d'ADN à partir de sang, lymphocytes, leucocytes, ou autre matériel) ou d'autres méthodes d'extraction d'ADN validées
- Pipettes à piston (0,5-250 µL)
- Embouts stériles avec filtre intégré
- Thermocycleur, (par exemple : PTC 200, *MJ Research/BioRad*, équipé d'un couvercle chauffant et ajustable)

  N.B.: veuillez consulter la liste des thermocycleurs validés par nos soins **page 7 !**

Dispositifs et matériel pour l'électrophorèse sur gel

- Agarose, qualité biologie moléculaire
- Tampon TBE 0,5x (Tris 45 mM, acide borique 45 mM, EDTA 0,5 mM)
- Bromure d'éthidium (EtBr)
- Appareil d'électrophorèse à gel immergé (au moins 25 puits)
- Générateur électrique (200-300 V, 200 mA)
- Échelle de P.M. (p.ex. Réf. 7097)

Dispositifs pour l'interprétation et la documentation

- Table UV transilluminante (220-310 nm)
- Système d'acquisition d'image (par exemple: appareil photo *Polaroïd* avec films 667) ou un système vidéo avec imprimante (par exemple: le modèle *KP65HM-CE*)
- Si possible un logiciel d'aide à l'interprétation, installé sur son PC (par exemple: application **HISTO MATCH** de *BAG Healthcare*) ou le logiciel *SCORE* largement distribué à travers le monde

2.3. Conservation et stabilité

La trousse est livrée dans un emballage ne contenant pas de réfrigérant (non congelée). Après réception conserver tous les réactifs entre –20 °C et –80 °C à l'obscurité. La date de péremption est indiquée sur l'étiquette de chaque réactif. Elle est/ elle reste également valable une fois les réactifs ouverts. La date de péremption indiquée sur l'étiquette externe correspond au réactif ayant la validité la plus courte dans la trousse. Décongeler le tampon PCR 10x peu de temps avant utilisation.

3. Données de performance

La composition de tous les mélanges d'amorces a été faite pour garantir une identification fiable des génotypes HLA (ce choix repose sur les données de séquence le plus récents) listés sur les fiches d'interprétation fournis. Les mises à jour sont effectuées de façon régulière.

L'exactitude et la reproductibilité concernant la spécificité de chaque mélange d'amorces ont été vérifiées pour chaque lot mis sur le marché sur un panel d'ADN connus (échantillons de référence) dont le typage HLA est parfaitement connu. Les allèles qui n'ont pas été listés car ils n'ont pas été testés du fait de leur rareté, sont identifiés sur la fiche d'interprétation et la fiche des spécificités.

Une étude de performance a été réalisée sur toutes les trousses HISTO TYPE SSP mettant en œuvre un minimum 50 échantillons d'ADN. Un autre aspect de cette étude concerne la comparaison des résultats de typage aux typages réalisés avec des trousses SSP d'autres fabricants ; aucune discordance n'a été constatée lors de ces comparaisons.

Les études de performance et tout contrôle de qualité des amorces contenus dans nos kits ont été effectués avec des ADN qui ont été isolés soit à l'aide du kit EXTRA GENE I ou encore par une technique de marque *Quiagen*. Les Taq Polymérases utilisées sont soit la HISTO TAQ (Réf. 70975) ou la Taq Polymérase (Réf. ……) de la société *Quiagen*.

Un typage fiable est garanti à condition d'utiliser une quantité d'ADN qui est comprise entre 50-80 ng / mélange réactionnel.

4. Protocole

4.1. Conditions de sécurité et remarques spécifiques

La PCR est une méthode particulièrement sensible qui doit être réalisée par du personnel bien formé, ayant l'expérience des techniques de génétique moléculaire et des tests d'histocompatibilité. Les directives concernant la transplantation ainsi que les normes EFI / DGI en vigueur doivent être respectées, de manière à réduire le risque de typages

erronés, et tout particulièrement dans le cas où des résultats discordants entre la sérologie et la méthode de génétique moléculaire sont observés.

Des conditions particulières de sécurité doivent être respectées pour éviter la contamination et donc les fausses réactions.

- Porter des gants pour manipuler (sans poudre si possible).
- Utiliser de nouveaux embouts pour chaque étape de pipetage (avec un filtre intégré).
- Utiliser des zones de travail séparées pour les tâches avant l'amplification (isolement de l'ADN et préparation des réactions) et après l'amplification (électrophorèse sur gel, documentation). De préférence, utiliser deux pièces différentes.
- Utiliser les dispositifs et autres matériels uniquement à leur place respective et ne pas les échanger.

4.2. Isolement de l'ADN

Le typage HLA-SSP d'un patient nécessite 5-10 µg d'ADN (correspondant à environ 0,5 mL de sang). La trousse **BAG EXTRA-GENE** est particulièrement adaptée pour l'isolement puisque un ADN pur peut être obtenu rapidement à partir du sang total, sans utiliser de produits chimiques ni de solvants toxiques. D'autres méthodes commerciales (basées sur des techniques mettant en œuvre des colonnes ou des billes magnétiques) ou des techniques décrites dans la littérature [5], comme la méthode au CTAB (bromure de cétyl-tri-méthylammonium) ou encore une purification au phénol-chloroforme, permettent d'obtenir des ADN de puretés satisfaisantes. La présence d'héparine peut inhiber la PCR [6]. De ce fait, il est recommandé d'utiliser du sang recueilli sur EDTA ou sur citrate pour le typage. Les ADN utilisés doivent disposer d'un indice de pureté (rapport $D.O._{260}/D.O._{280}$) qui est compris entre 1,5 et 2,0.

4.3. Amplification

Tous les mélanges réactionnels pré-aliquotés et séchés contiennent déjà les amorces spécifiques d'allèle et de contrôle, ainsi que les nucléotides. Ceux-ci sont livrés séchés dans la cupule réactionnelle. Les paramètres de l'amplification sont optimisés pour travailler avec un volume final de 10 µL.

1. Sortir le nombre nécessaire de plaques HISTO TYPE HLA-SSP du congélateur et décongeler le tampon PCR 10x à température ambiante

2. Préparer le mélange initial composé de tampon PCR 10x, de solution d'ADN, de Taq-polymérase et d'eau distillée et bien homogénéiser (vortex). Les différentes trousses HISTO TYPE SSP utilisent toutes le même mélange initial et peuvent de ce

fait être combinées. La composition du mélange initial en fonction du nombre de mélanges réactionnels est indiquée dans le tableau 1 (page 6)

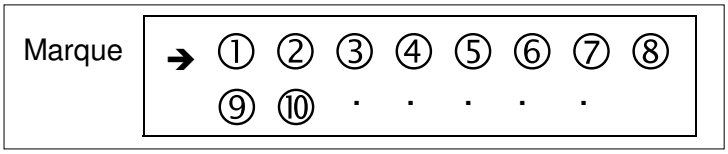
Dans le cas d'une réalisation d'un **contrôle de contamination**, réaliser tout d'abord le mélange initial sans la solution d'ADN et distribuer 10 µL de ce mélange dans la cupule du contrôle (contenant du colorant rouge). Ensuite, ajouter la solution d'ADN et distribuer le mélange initial dans les cupules réactionnelles pré-aliquotées.

Tableau 1. Composition du mélange initial en fonction du nombre de mélanges réactionnels :

Nb de cupules	Eau distillée	Tampon PCR 10x	Solution ADN (25-40 ng/µL)	Taq Polymerase (5 U/µL)	Volume total	
1	7	1	2	0.08	10	µL
4	55	8	16	0.6	80	µL
8	69	10	20	0.8	100	µL
24	194	28	56	2.2	280	µL
30	235	34	68	2.7	340	µL
32	249	36	72	2.9	360	µL
48	360	52	104	4.2	520	µL
54	401	58	116	4.6	580	µL
56	415	60	120	4.8	600	µL
72	540	78	156	6.2	780	µL
80	595	86	172	6.9	860	µL
96	706	102	204	8.2	1020	µL

⇨ **Chaque mélange réactionnel doit contenir 50–80 ng d'ADN**. Selon la concentration en ADN, les quantités d'ADN et d'eau doivent être modifiées (par exemple **pour 24 mélanges** : **28,0 µL** de solution d'ADN (**50 ng/µL**) et **222 µL** d'eau distillée)

3. Homogénéiser au Vortex et distribuer immédiatement **10 µL** de ce mélange dans les cupules réactionnelles pré-aliquotées et séchées. Changer d'embout après chaque étape de distribution.



Bien fermer les tubes avec les bouchons respectifs. S'assurer de ne pas toucher la paroi interne des bouchons ni les bords supérieurs des tubes avec les doigts pour éviter les contaminations. En cas d'utilisation de thermocycleurs équipés de capot fermé étroitement, il est également possible d'utiliser des tapis de silicone réutilisables

Agiter légèrement la plaque vers le bas pour dissoudre le résidu bleu situé au fond de la cupule. Toute la solution PCR doit se déposer au fond de la cupule

4. Placer les tubes réactionnels dans le thermocycleur et bien serrer le couvercle pour que les cupules réactionnelles ne se déforment pas à la chaleur. Lancer le programme PCR. Il n'est **pas** nécessaire de recouvrir les mélanges réactionnels avec de l'huile minérale en présence d'un couvercle chauffant et ajusté

Paramètres d'amplification

Étape de programme	T°	Durée	Nb de cycles
Première dénaturation	96 °C	**5 mn**	1 cycle
Dénaturation	96 °C	20 s	5 cycles
Hybridation + extension	68 °C	1 mn	
Dénaturation	96 °C	20 s	10 cycles
Hybridation	64 °C	50 s	
Extension	72 °C	45 s	
Dénaturation	96 °C	20 s	15 cycles
Hybridation	61 °C	50 s	
Extension	72 °C	45 s	
Extension finale	72 °C	5 mn	1 cycle

Thermocycleurs <u>validés</u>:

PTC 100 / 200 / C1000
(*MJ Research/ BioRad*)

GeneAmp PCR-System 9600 & 9700
(**<u>N.B.:</u>** veuillez utiliser la vitesse de montée en température du modèle « classique » = **9600**)
(*ABI, Life Technologies*)

Mastercycler epGradient S
(**<u>N.B.:</u>** veuillez utiliser la fonction « simulate Mastercycler gradient »)
(*Eppendorf*)

Tprofessional
(Biometra)

<u>N.B. :</u> lors de l'usage de thermocycleurs à vitesse très rapide de montée et descente en température, il est recommandé de réduire ces vitesses

<u>Il peut être nécessaire d'optimiser ces paramètres d'amplification</u> du fait que les thermocycleurs de différents fabricants fonctionnent souvent différemment, voire un instrument du même type peut aussi montrer des performances différentes. Nous rappelons qu'il est nécessaire de vérifier, et le cas échéant, paramétrer tout autre appareil (optimisation des paramètres d'amplification si nécessaire) **et que la validation du matériel par l'utilisateur est nécessaire avant toute utilisation.**

Pour optimiser le protocole sur votre appareil, utiliser les consignes suivantes :

a. en cas de résultats **faussement positifs** (bandes non spécifiques, supplémentaires) <u>augmenter</u> la température d'hybridation par pas de 1 °C.

b. en cas de résultats **faussement négatifs** (bandes manquantes) réduire la température d'hybridation par pas de 1 °C et/ ou augmenter les durées d'hybridation par pas de 5 secondes et/ ou augmenter les durées de dénaturation par pas de 5 secondes.

<u>Il est recommandé d'utiliser des thermocycleurs régulièrement calibrés.</u> Pour contrôler la calibration de votre thermocycleur notre produit CYCLER-CHECK (Réf. 7104) **est particulièrement adaptée.**

<u>N.B. :</u> nous réalisons régulièrement le contrôle de tous les appareils utilisés par notre département *Contrôle de Qualité*, soit les systèmes **PTC-200, PTC-100** (*MJ Research*)**, 9700** (*ABI*), Mastercycler **epGradient S** (*Eppendorf*) et **Tprofessional** (*Biometra*)

Électrophorèse sur gel

La séparation des produits d'amplification est réalisée par électrophorèse sur un gel (horizontal) d'agarose. Le tampon d'électrophorèse recommandé est le TBE 0,5x (Tris 45 mM, acide borique 45 mM, EDTA 0,5 mM). Le gel doit contenir une concentration de 2,0-2,5 % d'agarose. Laisser le gel polymériser pendant au moins 30 minutes avant de déposer les échantillons. Une fois l'amplification terminée, sortir les échantillons du thermocycleur et déposer soigneusement la totalité des mélanges réactionnels sur chaque position du gel. Ajouter en plus 10 µL de l'échelle ADN pour la comparaison des tailles. Réaliser la séparation par électrophorèse à 10-12 V/cm (avec une distance de 20 cm entre les électrodes, environ 200-240 V) pendant 20-40 minutes. Une fois l'électrophorèse terminée, le gel complet est coloré dans une solution de bromure d'éthidium (EtBr) (environ 0,5 µg/mL d'EtBr dans de l'eau ou du tampon TBE) pendant 30-40 minutes. Il est également possible d'ajouter l'EtBr (0,5 µg/mL) au tampon d'électrophorèse ou au gel d'agarose. Au besoin, l'excès d'EtBr peut être éliminé en immergeant le gel dans de l'eau ou du tampon TBE 0,5x pendant 20-30 minutes.

4.4. Documentation et interprétation

Pour la documentation, visualiser l'amplification PCR à l'aide d'un transilluminateur UV (220-310 nm) et photographier avec un appareil photo, une pellicule et des filtres adaptés (ex. : polaroïd, pellicule de type 667). Choisir le temps d'exposition et l'ouverture pour que les bandes soient bien nettes et se détachent du fond sombre (données approximatives : ouverture 11, temps d'exposition 1 seconde).

Pour l'interprétation, utiliser le tableau de spécificité et le diagramme d'évaluation (voir feuille supplémentaire). Seules les bandes ayant la taille correcte par rapport à l'échelle ADN doivent être considérées positives. Les tailles correctes sont indiquées dans le tableau et le diagramme. Dans toutes les pistes sans amplification spécifique d'allèle, le contrôle interne de **1 070 pb** doit être clairement visible. Dans la plupart des pistes avec une amplification spécifique d'allèle, le contrôle interne est plus faible ou disparaît complètement. En cas de résultats incorrects, consulter le guide de dépannage (paragraphe 6.).

Aucune bande ne doit être visible sur le **contrôle de contamination**. En cas de contamination avec de l'ADN génomique, une bande est visible à 282 pb. Des bandes supplémentaires peuvent être présentes à 78 pb, 104 pb, 176 pb et autour de 580 pb. En cas de contamination avec les amplicons, des bandes sont visibles à 78 pb et/ou 104 pb et/ou 282 pb.

L'interprétation peut se faire à l'aide de l'application **HISTO MATCH** (*BAG Healthcare*) ou en utilisant le logiciel SCORE largement distribué à travers le monde.

5. Avertissements et traitement des déchets

Le bromure d'éthidium est un agent mutagène puissant. Porter des gants pour manipuler les gels ou les solutions contenant de l'EtBr. Noter les instructions d'utilisation et les avertissements et précautions du fabricant. Le transilluminateur émet une lumière UV à longueur d'onde très courte qui peut provoquer des brûlures de la peau et de la rétine. Utiliser un masque facial anti-UV.

Tous les produits biologiques utilisés pour l'extraction d'ADN, par exemple le sang ou un tissu humain doivent être manipulés comme des substances potentiellement infectieuses. Il est recommandé de respecter les précautions de sécurité adaptées pour manipuler les produits biologiques (ne pas pipeter à la bouche, utiliser des gants jetables pour manipuler les produits biologiques et réaliser le test, se désinfecter les mains une fois le test terminé).

Les produits biologiques doivent être inactivés avant leur élimination (ex. : dans un autoclave). Les produits jetables doivent être autoclavés ou incinérés après usage.

Un renversement de produits potentiellement infectieux doit être ramassé immédiatement avec du papier absorbant et les zones contaminées doivent être nettoyées avec un désinfectant standard adapté ou avec de l'alcool à 70 %. Les matériels utilisés pour nettoyer les renversements, y compris les gants, doivent être inactivés avant leur élimination (ex. : dans un autoclave).

6. Dépannage

Problème	Raison possible	Solution
Pas d'amplification, échelle ADN visible	ADN contaminé par des inhibiteurs de PCR	Ré-isoler l'ADN, essayer d'autres méthodes
	Concentration en ADN trop élevée ou trop faible	Modifier la concentration en ADN, ré-isoler l'ADN
	Enzyme absente ou en concentration trop faible	Faire le typage, modifier la concentration de l'enzyme
	ADN provenant de sang hépariné	Refaire le typage avec du sang recueilli sur EDTA ou citrate
	Paramètres d'amplification incorrects	Optimiser les paramètres d'amplification (voir §4.3) ✯
Échec répété sur certaines pistes (pas sur le contrôle d'amplification)	Fuite dans les tubes réactionnels ; perte d'eau et modification de la concentration au cours de la PCR	Bien fermer les tubes avec les bouchons ; utiliser d'autres tubes réactionnels
Amplification non spécifique, bandes supplémentaires (les bandes supplémentaires d'une taille non significative doivent être négligées)	Contamination par les produits d'amplification	Refaire le typage en suivant le protocole exact
	ADN contaminé par des sels	Ré-isoler l'ADN, essayer d'autres méthodes
	Concentration en ADN trop élevée	Utiliser moins d'ADN
	Concentration en enzyme trop élevée	Utiliser moins d'enzyme
	Paramètres d'amplification incorrects	Optimiser les paramètres d'amplification (voir §4.3) ✯
Le résultat donne plus de 2 spécificités	Contamination croisée (produits d'amplification), nouvel allèle	Vérifier les mélanges de typage (pas d'ADN ajouté), appliquer le protocole exact
Pas de bandes visibles ou bandes très faibles, échelle ADN invisible	Coloration à l'EtBr trop faible	Refaire la coloration
Le fond du gel est trop clair	Durée de coloration trop longue, concentration en EtBr trop élevée	Tremper le gel dans de l'eau ou du TBE, réduire la concentration en EtBr
Bande floue	Tampon d'électrophorèse trop chaud, ou « épuisé », mauvaise composition du tampon d'électrophorèse ou encore polymérisation insuffisant du gel	Réduire la tension, utiliser du tampon TBE 0,5x

✯ Si l'équipement et les matériels utilisés sont ceux proposés dans cette notice, l'optimisation des paramètres d'amplification ne doit être envisagée qu'en dernier ressort. Dans la plupart des cas, il est possible d'évaluer le test sans tenir compte des bandes supplémentaires de taille discordante.

7. Bibliographie

1. Bodmer, J., 1993. Immunogenetics **37**:79-94
2. Olerup, O., Zetterquist H., 1992. Tissue Antigens **39**:225-235
3. Olerup, O., Zetterquist H., 1993. Tissue Antigens **41**:55-56
4. Lu, Y.H. and Négre, S., 1993. Trends in Genetics **9**:297
5. Maniatis et al., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual.
   New York: Cold Spring Harbour Laboratory
6. Beutler, E. et al., 1990. BioTechniques **9**:166
7. Bunce, M., 1995. Tissue Antigens **46**:355-367

8. Explication des symboles utilisés sur les emballages

	Température de conservation
	Utiliser avant
	Consulter le mode d'emploi
S	Suffisant pour « n » tests
CONT	Contenu, contient
HLA TYPING	Déstiné au : Typage HLA
IFU	Notice d'utilisation
IVD	Déstiné à une utilisation « in vitro »
LOT	N° de Lot
PCRBUF |10x	Tampon PCR, concentré 10 x
PCRCAP	Couvercles pour barrettes PCR
PCRFOIL	Films de scellage pour barettes PCR
PCRPLATE	Plaques pour PCR
PCRSTRIP	Barrettes pour PCR
REACTIONMIX	Mix initial
REF	Code produit
WORKSHEET	Feuille d'interprétation

N.B. : pour les ***Notices d'utilisation*** en d'**autres langues**, veuillez utiliser ce lien :
http://www.bag-healthcare.com/en/Diagnostika/Downloads/